



19 FEDERAL REPUBLIC
OF GERMANY



GERMAN PATENT
AND TRADEMARK OFFICE

12

Unexamined Patent Application

10

DE 197 32 086 A1

21

Application number: 197 32 086.4

22

Filing date: July 25, 1997

43

Date laid open for
public inspection: January 28, 1999

51 Int. Cl.⁶:

C 12 Q 1/68

C 12 Q 1/06

C 12 Q 1/14

G 01 N 33/569

// (C12Q 1/14,C12R
1:46)(C12Q 1/06,C12R
1:01)

DE 197 32 086 A1

71 Applicant:
Universität Leipzig, 04109 Leipzig, DE

74 Representative:
Nenning, P., Dipl.-Chem. Dipl.-Jur. Dr.rer.nat. Dr.jur.,
04275 Leipzig

72 Inventor:
Eschrich, Klaus, Prof. Dr., 04277 Leipzig, DE; Rupf,
Stefan, Dr., 04275 Leipzig, DE

56 Citations:
EP 06 92 540 A2
WO 92 05 280 A1
Chemical Abstracts 126 (6/9/97): 302144z;
Blok, J.J. et al.: Bio Techniques 22 (1997)
700–704;
Chemical Abstracts 125 (1996): 233926t; Lee,
Soo-Youn et al.: Appl. Environ. Microbiol. 62
(1996) 3787–3793;

The following information is taken from documents filed by the applicant.

Application for examination in accordance with §44, German Patent Act has been filed.

54 Method for rapid quantitative determination of eubacteria

57 The object of the invention is to quantitatively determine eubacteria.

The object is achieved by placing the sample in an assay for competitive quantitative PCR containing forward and backward primers which bind to 16S rRNA genes of eubacteria, and further containing a defined quantity of standard DNA which has been obtained from forward or backward primer and a hybrid primer, and after completion of a reaction regime the quantity of DNA is determined. It is possible to quantitatively determine the sum of all eubacteria and to quantitatively determine the individual species.



⑯ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**

**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑯ **Offenlegungsschrift
DE 197 32 086 A 1**

⑯ Int. Cl. 6:
C 12 Q 1/68
C 12 Q 1/06
C 12 Q 1/14
G 01 N 33/569
// (C12Q 1/14,C12R
1:46)(C12Q 1/06,C12R
1:01)

⑯ Aktenzeichen: 197 32 086.4
⑯ Anmeldetag: 25. 7. 97
⑯ Offenlegungstag: 28. 1. 99

DE 197 32 086 A 1

⑯ Anmelder: Universität Leipzig, 04109 Leipzig, DE	⑯ Erfinder: Eschrich, Klaus, Prof. Dr., 04277 Leipzig, DE; Ruf, Stefan, Dr., 04275 Leipzig, DE
⑯ Vertreter: Nenning, P., Dipl.-Chem. Dipl.-Jur.Dr.rer.nat.Dr.jur., 04275 Leipzig	⑯ Entgegenhaltungen: EP 06 92 540 A2 WO 92 05 280 A1 Chemical Abstracts 126 (9.6.97):302144z; Blok, J.J. et al.: Bio Techniques 22 (1997) 700-704; Chemical Abstracts 125 (1996):239926t; Lee, Soo-Youn et al.; Appl.Environ.Microbiol. 62 (1996) 3787-3793;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eubakterien
⑯ Es ist die Aufgabe gestellt, Eubakterien quantitativ zu bestimmen.
Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß die Probe in einen Ansatz einer competitiven quantitativen PCR gegeben wird, der Vorwärts- und Rückwärts-Primer enthält, die an 16 S rRNA-Gene von Eubakterien binden, und der weiterhin eine definierte Menge Standard-DNA enthält, die aus Vorwärts- oder Rückwärts-Primer sowie einem Hybrid-Primer erhalten wurde, und daß nach Absolvieren eines Reaktionsregimes die DNA-Menge ermittelt wird. Es sind die quantitative Bestimmung der Summe aller Eubakterien sowie die quantitative Einzelbestimmung der Spezies möglich.

DE 197 32 086 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Gesamtzahl von Eubakterien sowie der Anzahl von Eubakterien einzelner Spezies.

Es ist bereits bekannt, Eubakterien nachzuweisen und ihre Zahl zu erfassen. Im allgemeinen erfolgt dabei keine Differenzierung der Bakterienspezies, zumindest ist diese nicht ausreichend. So hat das Kultivieren von Eubakterien auf Nährmedien den Nachteil, daß viele Bakterienarten gar nicht angesprochen und zum Wachstum veranlaßt werden. Die Ursache liegt in der mangelnden Eignung der kommerziellen oder üblichen Nährmedien. Viele Bakterienarten wachsen nur recht und schlecht, was auch auf die bisher unzureichende Erforschung der Kultivierungsbedingungen für viele Bakterien zurückzuführen ist.

Für die quantitative Erfassung einzelner Bakterienspezies ist weiterhin die Unspezifität der Nährmedien nachteilig. Mehrere Keimspezies wachsen mit ähnlicher Intensität und verhindern eine Differenzierung. Es können auch nicht alle gewünschten Spezies erfaßt werden, weil eben nur lebende, unbeschädigte Zellen wachsen, während die anderen aus einem Nachweis herausfallen. Dazu kommt, daß die Stoffwechselprodukte der einen Spezies das Wachstum der andren stören können, so daß eine weitere Meßergebnisverfälschung Platz greift.

Nachteilig sind auch Zeitbedarf und Kosten. Der Zeitbedarf resultiert aus der gegebenen Geschwindigkeit der Zellvermehrung, die Kosten aus der Notwendigkeit der Verwendung spezieller Substrate, dem Einhalten spezifischer Kulturbedingungen und der Pflege der Kulturen, die apparativen und manuellen Aufwand erfordert.

Ein Teil der Bakterien darf aus Gründen erlassener Vorschriften nur mit Testkits untersucht werden. Diese sind teuer. Der Ausweg wäre das Durchführen der Arbeiten in einem zertifizierten Labor. Das ist noch teurer und für Routineuntersuchungen nicht mehr denkbar.

Es ist weiterhin bekannt, Eubakterien durch Phasenkontrast- und/oder Dunkelfeldmikroskopie nachzuweisen und zu bestimmen.

Das hat aber den Nachteil, daß die Identifizierung subjektiv verfälscht ist. Ursache dafür ist die Beurteilung des Gesichtsfeldes im Mikroskop durch einen zwar erfahrenen Mikrobiologen, der aber doch auf visuelle Weise arbeitet mit den daraus resultierenden Fehlerquellen. Auf diese Weise können Gruppen von Bakterienspezies identifiziert werden, meist keine einzelnen Arten. Der Grund ist in der habituellen Ähnlichkeit der Untersuchungsobjekte zu sehen. Nachteilig ist weiterhin, daß der Analyt nur im status quo untersucht werden kann. Das kommt daher, daß unter den Analysebedingungen die Bakterien nicht wachsen können.

Weiterhin sind' Arbeiten bekannt geworden, Eubakterien über ihre Stoffwechselprodukte zu identifizieren. Allerdings sind viele Bakterien so nicht zu erfassen. Das liegt daran, daß nur eine begrenzte Anzahl von Stämmen und Arten spezifisch nachweisbare Stoffwechselprodukte frei setzt. Das wiederum führt dazu, daß Gruppen von Bakterien erfaßt werden, weil verwandte Arten auch ähnliche Stoffwechselprodukte ausscheiden. Und eine Quantifizierung der Bakterien über ihre Stoffwechselprodukte ist gleich gar nicht möglich, weil die Intensität des Stoffwechsels weder steuerbar noch reproduzierbar ist.

Es ist darüber hinaus bekannt, Eubakterien mit immunologischen Methoden nachzuweisen. Diese Methoden sind teuer. Ursache ist das notwendige Verwenden polyklonaler Antiseren oder monoklonaler Antikörper, die nur unter hoher Zeit- und Mitteleinsatz selbst herzustellen oder teuer zu erwerben sind. Diese Methoden haben sich daher nicht all-

gemein durchsetzen können. Eine Quantifizierung einzelner Bakterienspezies mittels immunologischer Methoden ist nur bedingt möglich, da die Expression von Antigenen starken Schwankungen unterliegen kann. Für eine Erfassung der Gesamtbakterienzahl eignen sich immunologische Verfahren wegen der hohen Spezifität der Antikörper prinzipiell nicht.

Schließlich sind nucleinsäurebasierte Methoden bekannt. Diese werden in Hybridisierungsmethoden und in Polymerasekettenreaktion (PCR)-Verfahren unterschieden. Die Hybridisierungsmethoden setzen die Kenntnis geeigneter, meist mehrere hundert Basenpaare langer Zielsequenzen voraus. Bisher zeigt sich, daß die erreichte Sensitivität der Hybridisierungsverfahren unzureichend ist. Die Ursache liegt darin, daß nur die gerade vorhandene Zahl von Bakterien nachgewiesen wird und keine Vermehrung des Analyten geschieht. Die bisher eingesetzten sekundären Verstärkungsmittel sind störanfällig und verhindern letztlich eine ausreichend genaue Quantifizierung. Hohe Sensitivität ist nur durch radioactive Methoden zu erreichen. Die Begleitumstände aber sind eine aufwendige Methodik und Schwierigkeiten bei der Entsorgung der radioaktiven Abfälle.

Die PCR setzt die Kenntnis zweier kurzer, in geeignetem Abstand (hundert bis 2000 Basenpaare) voneinander entfernter Sequenzen für die Primerbindung voraus. Sie ist, neben der Kultivierung, die einzige Keimnachweismethode, bei der eine Vermehrung des Analyten erfolgt. Der Keimnachweis erfolgt über die Amplifikation der Zielsequenz (Template). Die PCR ist eine qualitative Methode. Zwischen Template- und Produktmenge besteht ein extrem nichtlinearer, von zahlreichen experimentell schwer kontrollierbaren Einflußgrößen bestimmter Zusammenhang. Daher erlaubt die PCR beim Bakteriennachweis nur eine ja/nein-Antwort, bestenfalls eine halb-quantitative Abschätzung der Keimmenge, jedoch keine Quantifizierung. Die Kombination von hoher Sensitivität und fehlender Quantifizierbarkeit führt leicht zu falsch-positiven Ergebnissen. Damit ist die PCR für den Nachweis von Bakterien oft zu empfindlich und hat sich deshalb bisher in der Praxis nicht durchsetzen können.

Die Erfindung hat das Ziel eine einfache, schnelle und preiswerte Methodik anzugeben, nach der Eubakterien nachgewiesen und quantitativ bestimmt werden können.

Die Aufgabe ist darin zu sehen, in Ausgangsproben völlig unterschiedlicher Herkunft, zum Beispiel in humanem Gewebe, in Sputum, aber auch in Abwasser, Kompostabluft und dergleichen Eubakterien zu bestimmen. Dabei soll eine Gesamtbestimmung der Bakterien ebenso möglich sein wie der Einzelnachweis und die entsprechende Bestimmung einzelner Bakterienspezies. Jedermann soll den Bakterientest durchführen können, unabhängig von der Pathogenität der nachzuweisenden Erreger.

Die Aufgabe wird erfahrungsgemäß dadurch gelöst, daß wie folgt verfahren wird.

Von den verschiedenen methodischen Varianten der quantitativen PCR wird die kompetitive qPCR mit homologem inneren Standard als Grundlage gewählt. Eine solche qPCR-Methode wird zur Bestimmung der Gesamtbakterienzahl verwendet (Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eubakterien in ihrer Summe). Dazu werden durch Datenbankanalyse hochkonservierte Teilsequenzen in den 16S rRNA-Genen von Eubakterien gesucht und zwei dazu komplementäre PCR-Primer (Vorwärts- und Rückwärts-Primer) synthetisiert. Mit diesen Primern ist ein PCR-Nachweis von Eubakterien unterschiedlicher Spezies möglich. Dagegen werden mit Archaeabakterien und Eukaryonten keine Amplifikate erhalten. Zur Gewinnung des homologen Standards wird ein Hybrid-Primer entworfen, der an eine Basenfolge

innerhalb der mit Vorwärts- und Rückwärts-Primer amplifizierten Templatesequenz bindet und an seinem 5'-Ende die Sequenz des Vorwärts- oder Rückwärts-Primers trägt. Mit dem Hybrid-Primer und dem Rückwärts-Primer wird durch PCR mit E. coli DNA als Template der Standard synthetisiert. Bei Zugabe bekannter Mengen dieses Standards zu bakterienhaltigen Proben und anschließender PCR mit dem Vorwärts- und dem Rückwärts-Primer wird ein Amplifikat gemisch erhalten, dessen Zusammensetzung aus PCR-Produkt von Bakterien-DNA und PCR-Produkt vom Standard exakt das Verhältnis der Moleküle von Bakterien-DNA und Standard in der Probe widerspiegelt. Aus diesem Verhältnis und der bekannten Menge zugesetzten Standards kann die in der Probe vorhandene Menge Bakterien-DNA bestimmt werden. Da die DNA-Menge pro Zelle konstant ist, erlaubt das Ergebnis eine Ermittlung der Zellzahl. Die Bestimmung der Mengenverhältnisse der PCR-Produkte von Bakterien-DNA und Standard-DNA erfolgt entweder

- Nach Auf trennung der Amplifikate in der Agarosegelektrophorese und DNA-Färbung mittels Ethidiumbromid durch Videodensitometrie oder
- (bei Verwendung eines der beiden PCR-Primer in 5'-biotinylierter Form) nach Immobilisierung an fixiertem Streptavidin durch Hybridisierung mit zwei an verschiedene Produktsequenzen bindende, Digoxigeninmarkierte Sonden mittels Enzyme-linked Oligonukleotide Sorbent Assay (ELOSA) unter Verwendung Enzym-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper.

Die quantitative Bestimmung einzelner Bakterienspezies erfolgt mit analogen Methoden der kompetitiven PCR. Abweichend zum obigen Vorgehen werden dabei durch Datenbankanalyse gerade speziespezifische Teilsequenzen im 16S rRNA-Gen des jeweiligen Bakteriums gesucht und zwei dazu komplementäre PCR-Primer (Vorwärts- und Rückwärts-Primer) synthetisiert. Die Spezifität dieser Primer wird in PCR überprüft, die PCR-Bedingungen entsprechend optimiert. Zur Gewinnung des homologen Standards wird ein Hybrid-Primer entworfen, der an eine Basenfolge innerhalb der mit den Primern amplifizierten Templatesequenz bindet und an seinem 5'-Ende die Sequenz des Vorwärts-Primers trägt. Mit dem Hybrid-Primer und dem Rückwärts-Primer wurde durch PCR mit DNA der zu quantifizierenden Bakterienspezies als Template der Standard synthetisiert. Bei Zugabe bekannter Mengen dieses Standards zu bakterienhaltigen Proben und anschließender PCR mit dem Vorwärts- und dem Rückwärts-Primer wird ein Amplifikat gemisch erhalten, dessen Zusammensetzung aus PCR-Produkt von Bakterien-DNA und PCR-Produkt vom Standard exakt das Verhältnis der Moleküle von Bakterien-DNA und Standard in der Probe widerspiegelt. Aus diesem Verhältnis und der bekannten Menge zugesetzten Standards kann die in der Probe vorhandene Menge Bakterien-DNA bestimmt werden. Da die DNA-Menge pro Zelle konstant ist, erlaubt das Ergebnis eine Ermittlung der Zellzahl. Die Bestimmung der Mengenverhältnisse der PCR-Produkte von Bakterien-DNA und Standard-DNA erfolgt wie oben für die eubakterienspezifische PCR beschrieben.

Die Spezies-spezifischen Methoden der kompetitiven PCR wurden von uns bisher für mehrere Zahn- und Zahnbetterkrankungsrelevante pathogene Bakterien entwickelt. Sie eignen sich jedoch prinzipiell zur Quantifizierung aller Eubakterien, für die 16S rRNA-Gensequenzen bekannt sind.

Im folgenden wird das erfundungsgemäße Verfahren in Ausführungsbeispielen erläutert.

1. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eubakterien in ihrer Summe

Vorwärts-Primer: ACTACGTGCCAGCAGCC

5 Rückwärts-Primer: GGACTACCAGGGTATCTAATCC
Hybrid-Primer: ACTACGTGCCAGCAGCCCAAGTCAGATGTGAAATCC

1.1. Synthese des homologen Kompetitors (Standard)

10 Mit Hybrid-Primer und Rückwärts-Primer wird eine PCR unter Verwendung von E. coli DNA als Template durchgeführt.

Reaktionsbedingungen:

15 Ansatzvolumen: 50 µl
Primerkonzentration: je 40 pmol/Ansatz
dNTPs: je 2,5 nMol/Ansatz
Magnesiumchlorid: 0,1 µMol/Ansatz
Puffer: 5 µl 10 × Taq-Puffer

20 Template: 1 ng E. coli DNA
Taq-Polymerase: 1,25 U Ampli-Taq Gold (Applied Biosystems)

Thermocycler: GeneAmp 2400 (Applied Biosystems)

Temperaturprofil:

25 initiale Denaturierung: 10 min 95°C

Zyklen:

Denaturierung: 1 min 95°C

Annealing und Extension: 1 min 66°C

Anzahl: 40

30 Final Extension: 10 min 66°C.

Nach Behandlung mit Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I wurde das PCR-Produkt (= Standard, 229 Basenpaare) in die Sinai-Stelle von pUC18 kloniert.

1.2. Ermittlung einer Eichkurve

Vorwärts-Primer: ACTACGTGCCAGCAGCC

Rückwärts-Primer: GGACTACCAGGGTATCTAATCC.

Mit diesen Primern wird eine Serie von PCR durchgeführt.

40 Reaktionsbedingungen: wie oben, aber

Template: 350 Moleküle Standard

5–1000 Bakterien-Zellen

Thermocycler, Temperaturprofil und Zyklen wie oben.

Produkte: Standard (229 Basenpaare), Bakterien-PCR-Produkt (294 Basenpaare).

1.3. Quantitative Bestimmung PCR-Produkte

1.3.1. Auf trennung der Produkte von 1.2. auf 2% Agarosegel, Anfärben mit Ethidiumbromid, videodensitometrische Bestimmung der Mengen der beiden PCR-Produkte.

1.3.2. (bei Verwendung des Rückwärts-Primers in 5'-biotinylierter Form) nach Teilung des PCR-Produkts in zwei Aliquote erfolgt Bindung an mit Streptavidin beschichtetes

55 Reaktionsgefäß (Mikrotiterplatte), Denaturierung mit NaOH, Hybridisierung mit je einer Digoxigeninmarkierten DNA-Sonde,

eine spezifisch für die Sequenz, die den Amplifikaten von Bakterien-DNA und Standard gemeinsam ist (DIG-

60 GCTCAGGTGCGAAAGCGTG) und eine die an die Sequenz bindet, die im PCR-Produkt von Bakterien-DNA, nicht aber im PCR-Produkt vom Standard vorhanden ist (DIG-CGGAGGGTGCAAGCGTTAAC).

Anschließende absorptionsphotometrische quantitative

65 Bestimmung der gebundenen Sondenmengen mittels Enzyme-linked Oligonukleotide Sorbent Assay (ELOSA) unter Verwendung Peroxidase-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper; Auswertung im Mikro-titerplattenphotometer (Anthos).

1.4. Erstellen einer Eichkurve

Auftragen des Quotienten der PCR-Produktmengen von Standard und Bakterien gegen die vorgelegte Bakterienzahl (unter Berücksichtigung von 7 Kopien des 16S rRNA-Gens je Bakteriengenom).

1.5. Quantitative Bestimmung von Eubakterien

Wie unter 1.2 aber anstelle der *E. coli*-Zellen 2 µl bakterienhaltige Probe.

Behandlung der PCR-Produkte wie unter 1.3.

Auswertung des gemessenen Quotienten der PCR-Produktmengen von Standard und Probe mittels Eichkurve (1.4.).

2. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eubakterien einer Spezies am Beispiel der Bestimmungsmethode für *Streptococcus mutans*

Vorwärts-Primer: GGTCAAGGAAAGTCTGGAGTAA-AAGGCTA

Rückwärts-Primer: GCGTTAGCTCCGGCACTAACGCC

Hybrid-Primer: GCGTTAGCTCCGGCAC-TAAGCCGCTACCCACGCTTCGAGC

2.1. Synthese des homologen Kompetitors (Standard)

Mit Hybrid-Primer und Vorwärts-Primer wird eine PCR unter Verwendung von *Streptococcus mutans* DNA als Template durchgeführt.

Reaktionsbedingungen:

Ansatzvolumen: 50 µl

Primerkonzentration: je 40 pmol/Ansatz

dNTPs: je 2,5 nMol/Ansatz

Magnesiumchlorid: 0,1 µMol/Ansatz

Puffer: 5 µl 10 × Taq-Puffer

Template: 1 ng *Streptococcus mutans* DNA

Taq-Polymerase: 1,25 U Ampli-Taq Gold (Applied Biosystems)

Thermocycler: GeneAmp 2400 (Applied Biosystems)

Temperaturprofil:

initiale Denaturierung: 10 min 95°C

Zyklen:

Denaturierung: 1 min 95°C

Annealing: 1 min 55°C

Extension: 1 min 72°C

Anzahl: 40

Final Extension: 10 min 72°C.

Nach Behandlung mit Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I wurde das PCR-Produkt (= Standard, 217 Basenpaare) in die SmaI-Stelle von pUC18 kloniert.

2.2. Ermittlung einer Eichkurve

Vorwärts-Primer: GGTCAAGGAAAGTCTGGAGTAA-AAGGCTA

Rückwärts-Primer: GCGTTAGCTCCGGCACTAACGCC.

Mit diesen Primern wird eine Serie von PCR durchgeführt. Reaktionsbedingungen: wie oben, aber

Template: 350 Moleküle Standard

5–1000 Zellen *Streptococcus mutans*

Thermocycler, Temperaturprofil und Zyklen wie oben.

Produkte: Standard (217 Basenpaare), Bakterien-PCR-Produkt (282 Basenpaare).

2.3. Quantitative Bestimmung PC R-Produkte

2.3.1. Auftrennung der Produkte von 2.2. auf 2% Agarosegel, Anfärben mit Ethidiumbromid, videodensitometrische Bestimmung der Mengen der beiden PC R-Produkte

2.3.2. (bei Verwendung des Rückwärts-Primers in 5'-biotinylierter Form) nach Teilung des PCR-Produkts in zwei Aliquote Bindung an mit Streptavidin beschichtetes Reaktionsgefäß (Mikrotiterplatte), Denaturierung mit NaOH, Hybridisierung mit je einer Digoxigeninmarkierten DNA-Sonde, eine spezifisch für die Sequenz, die den Amplifikaten von *Streptococcus mutans*-DNA und Standard gemeinsam ist (DIG-CGTAACAGATGAGTGCTAGGTGTAGGC) und eine die an die Sequenz bindet, die im PCR-Produkt von *Streptococcus mutans*-DNA, nicht aber im PCR-Produkt vom Standard vorhanden ist (DIG-GGAGAGTGGAAITCCATGTGTAGCGGTG).

Anschließende absorptionsphotometrische quantitative Bestimmung der gebundenen Sondenmengen mittels Enzyme-linked Oligonukleotide Sorbent assay (ELOSA) unter Verwendung Peroxidase-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper; Auswertung im Mikrotiterplattenphotometer (Anthos).

2.4. Erstellen einer Eichkurve

Auftragen des Quotienten der PCR-Produktmengen von Standard und Bakterien gegen die vorgelegte Bakterienzahl (unter Berücksichtigung von 7 Kopien des 16S rRNA-Gens je Bakteriengenom).

2.5. Quantitative Bestimmung von *Streptococcus mutans*

Wie unter 2.2 aber anstelle der *Streptococcus mutans*-Zellen 2 µl bakterienhaltige Probe.

Behandlung der PCR-Produkte wie unter 2.3.

Auswertung des gemessenen Quotienten der PCR-Produktmengen von Standard und Probe mittels Eichkurve (2.4.).

3. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eubakterien einer Spezies am Beispiel der Bestimmungsmethode für *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

Vorwärts-Primer: GTTAGCCCTGGTCCCCGAAG

Rückwärts-Primer: TGACGGCGGTGTACAAGG

Hybrid-Primer: GTTTAGCCCTGGTCCCCGAAGCA-CAAGCGGTGGAGCATGTGG

3.1. Synthese des homologen Kompetitors (Standard)

Mit Hybrid-Primer und Rückwärtsprimer wird eine PCR unter Verwendung von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* DNA als Template durchgeführt.

Reaktionsbedingungen:

Ansatzvolumen: 50 µl

Primerkonzentration: je 40 pmol/Ansatz

dNTPs: je 2,5 nMol/Ansatz

Magnesiumchlorid: 0,1 µMol/Ansatz

Puffer: 5 µl 10 × Taq-Puffer

Template: 1 ng *Actinobacillus actinomycetemcomitans* DNA

Taq-Polymerase: 1,25 U Ampli-Taq Gold (Applied Biosystems)

Thermocycler: GeneAmp 2400 (Applied Biosystems)

Temperaturprofil:

initiale Denaturierung: 10 min 95°C

Zyklen:

Denaturierung: 1 min 95°C

Annealing: 1 min 55°C
Extension: 1 min 72°C

Anzahl: 40

Final Extension: 10 min 72°C.

Nach Behandlung mit Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I wurde das PCR-Produkt (= Standard, 473 Basenpaare) in die Sinai-Stelle von pUC18 kloniert.

3.2. Ermittlung einer Eichkurve

Vorwärts-Primer: GTTAGCCCTGGTGGCCCGAAG
Rückwärts-Primer: TGACGGCGGTGTACAAGG.

Mit diesen Primern wird eine Serie von PCR durchgeführt.

Reaktionsbedingungen: wie oben, aber
Template: 350 Moleküle Standard
5–1000 Zellen Actinobacillus actinomycetemcomitans
Thermocycler, Temperaturprofil und Zyklen wie oben.
Produkte: Standard (473 Basenpaare), Bakterien-PCR-Produkt (547 Basenpaare).

3.3. Quantitative Bestimmung PCR-Produkte

3.3.1. Auf trennung der Produkte von 3.2. auf 2% Agarosegel, Anfärben mit Ethidiumbromid, videodensitometrische Bestimmung der Mengen der beiden PCR-Produkte.

3.3.2. (bei Verwendung des Vorwärts-Primers in 5'-biotinylierter Form) nach Teilung des PCR-Produkts in zwei Aliquote Bindung an mit Streptavidin beschichtetes Reaktionsgefäß (Mikrotiterplatte), Denaturierung mit NaOH, Hybridisierung mit je einer Digoxigeninmarkierten DNA-Sonde, eine spezifisch für die Sequenz, die den Amplifikaten von Actinobacillus actinomycetemcomitans-DNA und Standard gemeinsam ist (DIG-GCACGTGTAGCCCTACTCGTAACCCG) und eine die an die Sequenz bindet, die im PCR-Produkt von Actinobacillus actinomycetemcomitans-DNA, nicht aber im PCR-Produkt vom Standard vorhanden ist (DIG-GTTTAAACCTTGCAGGCCGTACTGGG).

Anschließende absorptionsphotometrische quantitative Bestimmung der gebundenen Sondenmengen mittels Enzyme-linked Oligonukleotide Sorbent assay (ELOSA) unter Verwendung Peroxidase-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper; Auswertung im Mikrotiterplattenphotometer (Anthos).

3.4. Erstellen einer Eichkurve

Auftragen des Quotienten der PCR-Produktmengen von Standard und Bakterien gegen die vorgelegte Bakterienzahl (unter Berücksichtigung von 7 Kopien des 16S rRNA-Gens je Bakteriengenom).

3.5. Quantitative Bestimmung von Actinobacillus actinomycetemcomitans

Wie unter 3.2 aber anstelle der Actinobacillus actinomycetemcomitans-Zellen 2 µl bakterienhaltige Probe.

Behandlung der PCR-Produkte wie unter 3.3.

Auswertung des gemessenen Quotienten der PCR-Produktmengen von Standard und Probe mittels Eichkurve (3.4.).

4. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eubakterien einer Spezies am Beispiel der Bestimmungsmethode für Porphyromonas gingivalis

Vorwärts-Primer: GGGATTGAAATGTAGATGACTGATG
Rückwärts-Primer: CCTTCAGGTACCCCCGACT

Hybrid-Primer: GGGATTGAAATGTAGATGACTGATG
TCAGCTCGTGCCGTGAG

4.1. Synthese des homologen Kompetitors (Standard)

Mit Hybrid-Primer und Rückwärtsprimer wird eine PCR unter Verwendung von Porphyromonas gingivalis DNA als Template durchgeführt.

Reaktionsbedingungen:

Ansatzvolumen: 50 µl
Primerkonzentration: je 40 pmol/Ansatz
dNTPs: je 2,5 nMol/Ansatz
Magnesiumchlorid: 0,1 µMol/Ansatz
Puffer: 5 µl 10 × Taq-Puffer

Template: 1 ng Porphyromonas gingivalis DNA
Taq-Polymerase: 1,25 U Ampli-Taq Gold (Applied Biosystems)

Thermocycler: GeneAmp 2400 (Applied Biosystems)

Temperaturprofil:

initiale Denaturierung: 10 min 95°C

Zyklen: Denaturierung:

1 min 95°C

Annealing: 1 min 55°C

Extension: 1 min 72°C

Anzahl: 40

Final Extension: 10 min 72°C.

Nach Behandlung mit Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I wurde das PCR-Produkt (= Standard, 400 Basenpaare) in die SmaI-Stelle von pUC18 kloniert.

4.2. Ermittlung einer Eichkurve

Vorwärts-Primer: GGGATTGAAATGTAGATGACTGATG
Rückwärts-Primer: CCTTCAGGTACCCCCGACT.

Mit diesen Primern wird eine Serie von PCR durchgeführt.

Reaktionsbedingungen: wie oben, aber

Template: 350 Moleküle Standard
5–1000 Zellen Porphyromonas gingivalis

Thermocycler, Temperaturprofil und Zyklen wie oben.
Produkte: Standard (400 Basenpaare), Bakterien-PC R-Produkt (499 Basenpaare).

4.3. Quantitative Bestimmung PC R-Produkte

4.3.1. Auf trennung der Produkte von 4.2. auf 2% Agarosegel, Anfärben mit Ethidiumbromid, videodensitometrische Bestimmung der Mengen der beiden PCR-Produkte.

4.3.2. (bei Verwendung des Rückwärts-Primers in 5'-biotinylierter Form) nach Teilung des PCR-Produkts in zwei Aliquote Bindung an mit Streptavidin beschichtetes Reaktionsgefäß (Mikrotiterplatte), Denaturierung mit NaOH, Hybridisierung mit je einer Digoxigeninmarkierten DNA-Sonde,

eine spezifisch für die Sequenz, die den Amplifikaten von Porphyromonas gingivalis-DNA und Standard gemeinsam ist

(DIG-GTTTAAACCTTGCAGGCCGTACTGGG) und eine die an die Sequenz bindet, die im PCR-Produkt von Porphyromonas gingivalis-DNA, nicht aber im PCR-Produkt vom Standard vorhanden ist (DIG-GCACGTGTAGCCCTACTCGTAACCCG).

Anschließende absorptionsphotometrische quantitative Bestimmung der gebundenen Sondenmengen mittels Enzyme-linked Oligonukleotide Sorbent assay (ELOSA) unter Verwendung Peroxidase-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper;

Auswertung im Mikrotiterplattenphotometer (Anthos).

4.4. Erstellen einer Eichkurve

Auftragen des Quotienten der PCR-Produktmengen von Standard und Bakterien gegen die vorgelegte Bakterienzahl (unter Berücksichtigung von 7 Kopien des 16S rRNA-Gens je Bakteriengenom).

4.5. Quantitative Bestimmung von Porphyromonas gingivalis

Wie unter 4.2 aber anstelle der Porphyromonas gingivalis Zellen 2 µl bakterienhaltige Probe.

Behandlung der PCR-Produkte wie unter 4.3.

Auswertung des gemessenen Quotienten der PCR-Produktmengen von Standard und Probe mittels Eichkurve (4.4.).

5. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eubakterien einer Spezies am Beispiel der Bestimmungsmethode für Prevotella intermedia

Vorwärts-Primer: AACGGCATTATGTGCTTGAC

Rückwärts-Primer: CTCAAGTCCGCCAGTTGCG

Hybrid-Primer:

CTCAAGTCCGCCAGTTGCGCCCTGGACCTTCCGTA-TTACC

5.1. Synthese des homologen Kompetitors (Standard)

Mit Hybrid-Primer und Vorwärtsprimer wird eine PCR unter Verwendung von Prevotella intermedia DNA als Template durchgeführt.

Reaktionsbedingungen:

Ansatzvolumen: 50 µl

Primerkonzentration: je 40 pmol/Ansatz

dNTPs: je 2,5 nMol/Ansatz

Magnesiumchlorid: 0,1 µMol/Ansatz

Puffer: 5 µl 10 × Taq-Puffer

Template: 1 ng Prevotella intermedia DNA

Taq-Polymerase: 1.25 U Ampli-Taq Gold (Applied Biosystems)

Thermocycler: GeneAmp 2400 (Applied Biosystems)

Temperaturprofil:

initiale Denaturierung: 10 min 95°C

Zyklen: Denaturierung:

1 min 95°C

Annealing: 1 min 60°C

Extension: 1 min 72°C

Anzahl: 40

Final Extension: 10 min 72°C.

Nach Behandlung mit Klenow-Fragment der DNA-Polymerase 1 wurde das PCR-Produkt (= Standard, 502 Basenpaare) in die SmaI-Stelle von pUC18 kloniert.

5.2. Ermittlung einer Eichkurve

Vorwärts-Primer: AACGGCATTATGTGCTTGAC

Rückwärts-Primer: CTCAAGTCCGCCAGTTGCG.

Mit diesen Primern wird eine Serie von PCR durchgeführt.

Reaktionsbedingungen: wie oben, aber

Template: 350 Moleküle Standard

5–1000 Zellen Prevotella intermedia

Thermocycler, Temperaturprofil und Zyklen wie oben.

Produkte: Standard (502 Basenpaare), Bakterien-PCR-Produkt (489 Basenpaare).

5.3. Quantitative Bestimmung PCR-Produkte

5.3.1. Auftrennung der Produkte von 5.2. auf 2% Agarosegel, Anfärben mit Ethidiumbromid, videodensitometrische Bestimmung der Mengen der beiden PCR-Produkte.

5.3.2. (bei Verwendung des Rückwärts-Primers in 5'-biotinylierter Form) nach Teilung des PCR-Produkts in zwei Aliquote Bindung an mit Streptavidin beschichtetes Reaktionsgefäß (Mikrotiterplatte), Denaturierung mit NaOH, Hybridisierung mit je einer Digoxigeninmarkierten DNA-Sonde,

eine spezifisch für die Sequenz, die den Amplifikaten von Prevotella intermedia-DNA und Standard gemeinsam ist (DIG-GGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGG) und

eine die an die Sequenz bindet, die im PCR-Produkt von Prevotella intermedia-DNA, nicht aber im PCR-Produkt vom Standard vorhanden ist (DIG-GCGGTCTGTTAAGCGTGTGAAATT-TAGG).

Anschließende absorptionsphotometrische quantitative Bestimmung der gebundenen Sondenmengen mittels Enzyme-linked Oligonukleotide Sorbent assay (ELOSA) unter Verwendung Peroxidase-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper;

25 Auswertung im Mikrotiterplattenphotometer (Anthos).

5.4. Erstellen einer Eichkurve

Auftragen des Quotienten der PCR-Produktmengen von Standard und Bakterien gegen die vorgelegte Bakterienzahl (unter Berücksichtigung von 7 Kopien des 16S rRNA-Gens je Bakteriengenom).

5.5. Quantitative Bestimmung von Prevotella intermedia

Wie unter 5.2 aber anstelle der Prevotella intermedia Zellen 2 µl bakterienhaltige Probe.

Behandlung der PCR-Produkte wie unter 5.3.

Auswertung des gemessenen Quotienten der PCR-Produktmengen von Standard und Probe mittels Eichkurve (5.4.).

6. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eubakterien einer Spezies am Beispiel der Bestimmungsmethode für Eikenella corrodens

Vorwärts-Primer: CGATTAGCTGTGGGCAACTT

Rückwärts-Primer: ACCCTCTGTACCGACCATTGTAT

Hybrid-Primer: ACCCTCTGTACCGACCATTGTAT-

50 TACCTTCCTCCGGTTTGTC

6.1. Synthese des homologen Kompetitors (Standard)

Mit Hybrid-Primer und Vorwärtsprimer wird eine PCR unter Verwendung von Eikenella corrodens DNA als Template durchgeführt.

Reaktionsbedingungen:

Ansatzvolumen: 50 µl

Primerkonzentration: je 40 pmol/Ansatz

60 dNTPs: je 2,5 nMol/Ansatz

Magnesiumchlorid: 0,1 µMol/Ansatz

Puffer: 5 µl 10 × Taq-Puffer

Template: 1 ng Eikenella corrodens DNA

Taq-Polymerase: 1.25 U Ampli-Taq Gold (Applied Biosystems)

Thermocycler: GeneAmp 2400 (Applied Biosystems)

Temperaturprofil:

initiale Denaturierung:

10 min 95°C
 ·Zyklen: Denaturierung: 1 min 95°C
 Annealing: 1 min 55°C
 Extension: 1 min 72°C
 Anzahl: 40
 Final Extension: 10 min 72°C.

Nach Behandlung mit Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I wurde das PCR-Produkt (= Standard, 359 Basenpaare) in die SmaI-Stelle von pUC18 kloniert.

6.2. Ermittlung einer Eichkurve

Vorwärts-Primer: CGAATTAGCTGTGGGCAACCTT
 Rückwärts-Primer: ACCCTCTGTACCGACCAATTGTAT.
 Mit diesen Primern wird eine Serie von PCR durchgeführt.
 Reaktionsbedingungen: wie oben, aber
 Template: 350 Moleküle Standard
 5–1000 Zellen *Eikenella corrodens*
 Thermocycler, Temperaturprofil und Zyklen wie oben.
 Produkte: Standard (359 Basenpaare), Bakterien-PCR-Produkt (410 Basenpaare).

6.3. Quantitative Bestimmung PCR-Produkte

6.3.1. Auftrennung der Produkte von 6.2. auf 2% Agarosegel, Anfärben mit Ethidiumbromid, videodensitometrische Bestimmung der Mengen der beiden PCR-Produkte.
 6.3.2. (bei Verwendung des Rückwärts-Primers in 5'-biotinylierter Form) nach Teilung des PCR-Produkts in zwei Aliquote Bindung an mit Streptavidin beschichtetes Reaktionsgefäß (Mikrotiterplatte), Denaturierung mit NaOH, Hybridisierung mit je einer Digoxigeninmarkierten DNA-Sonde, eine spezifisch für die Sequenz, die den Amplifikaten von *Eikenella corrodens*-DNA und Standard gemeinsam ist (DIG-AACCGGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATG) und eine die an die Sequenzbindet, die im PCR-Produkt von *Eikenella corrodens*-DNA, nicht aber im PCR-Produkt vom Standard vorhanden ist (DIG-GGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCCATATG).

Anschließende absorptionsphotometrische quantitative Bestimmung der gebundenen Sondenmengen mittels Enzyme-linked Oligonukleotide Sorbent assay (ELOSA) unter Verwendung Peroxidase-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper; Auswertung im Mikrotiterplattenphotometer (Anthos).

6.4. Erstellen einer Eichkurve

Auftragen des Quotienten der PCR-Produktmengen von Standard und Bakterien gegen die vorgelegte Bakterienanzahl (unter Berücksichtigung von 7 Kopien des 16S rRNA-Gens je Bakteriengenom).

6.5. Quantitative Bestimmung von *Eikenella corrodens*

Wie unter 6.2 aber anstelle der *Eikenella corrodens* Zellen 2 µl bakterienhaltige Probe.
 Behandlung der PCR-Produkte wie unter 6.3.
 Auswertung des gemessenen Quotienten der PCR-Produktmengen von Standard und Probe mittels Eichkurve (6.4.).

Patentansprüche

1. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eu-bakterien **dadurch gekennzeichnet**, daß eine biologische Probe entnommen wird, in einen An-

satz einer competitiven quantitativen PCR gegeben wird, der Vorwärts- und Rückwärts-Primer enthält, die an in 16S rRNA-Genen von Eubakterien binden, und der eine definierte Menge einer Standard-DNA enthält, die in einer vorangegangenen PCR-Reaktion unter Verwendung von Vorwärts- oder Rückwärts-Primer und einem Hybrid-Primer, der an eine Basenfolge innerhalb der mit Vorwärts- und Rückwärts-Primer amplifizierten Templatesequenz bindet und an seinem 5'-Ende die Sequenz des Vorwärts- oder Rückwärts-Primers trägt,

und der an sich bekannte, für die PCR erforderliche Hilfs- und Nebenstoffe enthält; der Ansatz einschließlich der biologischen Probe wiederholt einem Temperaturregime unterworfen wird und quantitativ die beiden entstandenen Produkte entweder nach Auftrennung der Amplifikate in der Agarosegelektrophorese und DNA-Färbung mittels Ethidiumbromid durch Videodensitometrie oder bei Verwendung eines der beiden PCR-Primer in 5'-biotinylierter Form nach Immobilisieren an fixiertem Streptavidin durch Hybridisierung mit zwei an verschiedene Produktsequenzen bindende, Digoxigeninmarkierte Sonden mittels Enzyme-linked Oligonukleotide Sorbent Assay unter Verwendung Enzym-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper bestimmt werden

und anschließend aus dem Verhältnis der beiden Produktkonzentrationen und der bekannten Menge des zum PCR-Ansatz zugegebenen Standards die DNA-Menge der Probe ermittelt wird.

2. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eu-bakterien in ihrer Summe nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine biologische Probe entnommen wird, in einen Ansatz einer competitiven quantitativen PCR gegeben wird, der Vorwärts- und Rückwärts-Primer enthält, die an in 16S rRNA-Genen von Eubakterien hochkonservierte Teilsequenzen binden und der eine definierte Menge einer Standard-DNA enthält, die in einer vorangegangenen PCR-Reaktion unter Verwendung von Vorwärts- oder Rückwärts-Primer und einem Hybrid-Primer, der an eine Basenfolge innerhalb der mit Vorwärts- und Rückwärts-Primer amplifizierten Templatesequenz bindet und an seinem 5'-Ende die Sequenz des Vorwärts-, oder Rückwärts-Primers trägt, hergestellt worden sind

und der an sich bekannte, für die PCR erforderliche Hilfs- und Nebenstoffe enthält, der Ansatz einschließlich der biologischen Probe wiederholt einem Temperaturregime unterworfen wird

und quantitativ die beiden entstandenen Produkte entweder nach Auftrennung der Amplifikate in der Agarosegelektrophorese und DNA-Färbung mittels Ethidiumbromid durch Videodensitometrie oder bei Verwendung eines der beiden PCR-Primer in 5'-biotinylierter Form nach Immobilisieren an fixiertem Streptavidin durch Hybridisierung mit zwei an verschiedene Produktsequenzen bindende, Digoxigeninmarkierte Sonden mittels Enzyme-linked oligonukleotide Sorbent Assay unter Verwendung Enzym-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper bestimmt werden

und anschließend aus dem Verhältnis der beiden Produktkonzentrationen und der bekannten Menge des zum PCR-Ansatz zugegebenen Standards die DNA-Menge der Probe ermittelt wird.

3. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eu-bakterien einer Spezies nach Anspruch 1, dadurch ge-

kennzeichnet, daß eine biologische Probe entnommen wird, in einen Ansatz einer competitiven quantitativen PCR gegeben wird, der Vorwärts- und Rückwärts-Primer enthält, die an für diese Spezies spezifischen Teilsequenzen im 16S rRNA-Gen binden und eine definierte Menge einer Standard-DNA enthält, die in einer vorangegangenen PCR-Reaktion unter Verwendung von Vorwärts- oder Rückwärts-Primer und einem Hybrid-Primer, der an eine Basenfolge innerhalb der mit Vorwärts- und Rückwärts-Primer amplifizierten Templatesequenz bindet und an seinem 5'-Ende die Sequenz des Vorwärts-, oder Rückwärts-Primers trägt, hergestellt wurden, und an sich bekannte, für die PCR erforderliche Hilfs- und Nebenstoffe enthält, der Ansatz einschließlich der biologischen Probe wiederholt einem Temperaturregime unterworfen wird und quantitativ die beiden entstandenen Produkte entweder nach Auftrennung der Amplifikate in der Agaroseelektrophorese und DNA-Färbung mittels Ethidiumbromid durch Videodensitometrie oder bei Verwendung eines der beiden PCR-Primer in 5'-biotinylierter Form nach Immobilisieren an fixiertem Streptavidin durch Hybridisierung mit zwei an verschiedene Produktsequenzen bindende, Digoxigenin-markierte Sonden mittels Enzyme-linked Oligonukleotide Sorbent Assay unter Verwendung Enzym-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper bestimmt werden und anschließend aus dem Verhältnis der beiden Produktkonzentrationen und der bekannten Menge des zum PCR-Ansatz zugegebenen Standards die DNA-Menge der Probe ermittelt wird.

4. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Streptococcus mutans dadurch gekennzeichnet, daß eine biologische Probe entnommen wird, in einen Ansatz einer competitiven quantitativen PCR gegeben wird, der Vorwärts- und Rückwärts-Primer enthält, die an für Streptococcus mutans spezifischen Teilsequenzen im 16S rRNA-Gen binden und der Ansatz eine definierte Menge einer Standard-DNA enthält, die in einer vorangegangenen PCR-Reaktion unter Verwendung von Vorwärts-Primer und einem Hybrid-Primer, der an eine Basenfolge innerhalb der mit Vorwärts- und Rückwärts-Primer amplifizierten Templatesequenz bindet und an seinem 5'-Ende die Sequenz des Rückwärts-Primers trägt, hergestellt wurde und der an sich bekannte, für die PCR erforderliche Hilfs- und Nebenstoffe enthält, der Ansatz einschließlich der biologischen Probe 40 mal folgendem Temperaturregime unterworfen wird: initiale Denaturierung: 10 min 95°C, Denaturierung: 1 min 95°C, Annealing: 1 min 55°C, Extension: 1 min 72°C, Final Extension: 10 min 72°C und quantitativ die beiden entstandenen Produkte entweder nach Auftrennung der Amplifikate in der Agaroseelektrophorese und DNA-Färbung mittels Ethidiumbromid durch Videodensitometrie oder bei Verwendung eines der beiden PCR-Primer in 5'-biotinylierter Form nach Immobilisieren an fixiertem Streptavidin durch Hybridisierung mit zwei an verschiedene Produktsequenzen bindende, Digoxigenin-markierte Sonden mittels Enzyme-linked Oligonukleotide Sorbent Assay unter Verwendung Enzym-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper bestimmt werden und anschließend aus dem Verhältnis der beiden Produktkonzentrationen und der bekannten Menge des zum PCR-Ansatz zugegebenen Standards die DNA-Menge der Probe ermittelt wird.

5. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Porphyromonas gingivalis dadurch gekennzeichnet, daß eine biologische Probe entnommen wird, in einen Ansatz einer competitiven quantitativen PCR gegeben wird, der Vorwärts- und Rückwärts-Primer enthält, die an für Porphyromonas gingivalis spezifischen Teilsequenzen im 16S rRNA-Gen binden und der Ansatz eine definierte Menge einer Standard-DNA enthält, die in einer vorangegangenen PCR-Reaktion unter Verwendung von Rückwärts-Primer und einem Hybrid-Primer, der an eine Basenfolge innerhalb der mit Vorwärts- und Rückwärts-Primer amplifizierten Templatesequenz bindet und an seinem 5'-Ende die Sequenz des Vorwärts-Primers trägt, hergestellt wurde und der an sich bekannte, für die PCR erforderliche Hilfs- und Nebenstoffe enthält,

zum PCR-Ansatz zugegebenen Standards die DNA-Menge der Probe ermittelt wird.

5. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Actinobacillus actinomycetemcomitans dadurch gekennzeichnet, daß eine biologische Probe entnommen wird, in einen Ansatz einer competitiven quantitativen PCR gegeben wird, der Vorwärts- und Rückwärts-Primer enthält, die an für Actinobacillus actinomycetemcomitans spezifischen Teilsequenzen im 16S rRNA-Gen binden und der Ansatz eine definierte Menge einer Standard-DNA enthält, die in einer vorangegangenen PCR-Reaktion unter Verwendung von Rückwärts-Primer und einem Hybrid-Primer, der an eine Basenfolge innerhalb der mit Vorwärts- und Rückwärts-Primer amplifizierten Templatesequenz bindet und an seinem 5'-Ende die Sequenz des Vorwärts-Primers trägt, hergestellt wurde und der an sich bekannte, für die PCR erforderliche Hilfs- und Nebenstoffe enthält, der Ansatz einschließlich der biologischen Probe 40 mal folgendem Temperaturregime unterworfen wird: initiale Denaturierung: 10 min 95°C, Denaturierung: 1 min 95°C, Annealing: 1 min 55°C, Extension: 1 min 72°C, Final Extension: 10 min 72°C und quantitativ die beiden entstandenen Produkte entweder nach Auftrennung der Amplifikate in der Agaroseelektrophorese und DNA-Färbung mittels Ethidiumbromid durch Videodensitometrie oder bei Verwendung eines der beiden PCR-Primer in 5'-biotinylierter Form nach Immobilisieren an fixiertem Streptavidin durch Hybridisierung mit zwei an verschiedene Produktsequenzen bindende, Digoxigenin-markierte Sonden mittels Enzyme-linked Oligonukleotide Sorbent Assay unter Verwendung Enzym-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper bestimmt werden und anschließend aus dem Verhältnis der beiden Produktkonzentrationen und der bekannten Menge des zum PCR-Ansatz zugegebenen Standards die DNA-Menge der Probe ermittelt wird.

6. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Porphyromonas gingivalis dadurch gekennzeichnet, daß eine biologische Probe entnommen wird, in einen Ansatz einer competitiven quantitativen PCR gegeben wird, der Vorwärts- und Rückwärts-Primer enthält, die an für Porphyromonas gingivalis spezifischen Teilsequenzen im 16S rRNA-Gen binden und der Ansatz eine definierte Menge einer Standard-DNA enthält, die in einer vorangegangenen PCR-Reaktion unter Verwendung von Rückwärts-Primer und einem Hybrid-Primer, der an eine Basenfolge innerhalb der mit Vorwärts- und Rückwärts-Primer amplifizierten Templatesequenz bindet und an seinem 5'-Ende die Sequenz des Vorwärts-Primers trägt, hergestellt wurde und der an sich bekannte, für die PCR erforderliche Hilfs- und Nebenstoffe enthält,

der Ansatz einschließlich der biologischen Probe 40 mal folgendem Temperaturregime unterworfen wird: initiale Denaturierung: 10 min 95°C, Denaturierung: 1 min 95°C, Annealing: 1 min 55°C, Extension: 1 min 72°C, Final Extension: 10 min 72°C und quantitativ die beiden entstandenen Produkte entweder nach Auftrennung der Amplifikate in der Agaroseelektrophorese und DNA-Färbung mittels Ethidiumbromid durch Videodensitometrie oder bei Verwendung eines der beiden PCR-Primer in 5'-biotinylierter Form nach Immobilisieren an fixiertem Streptavidin durch Hybridisierung mit zwei an verschiedene Produktsequenzen bindende, Digoxigenin-

markierte Sonden mittels Enzyme-linked Oligonukleotide Sorbent Assay unter Verwendung Enzym-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper bestimmt werden und anschließend aus dem Verhältnis der beiden Produktkonzentrationen und der bekannten Menge des zum PCR-Ansatz zugegebenen Standards die DNA-Menge der Probe ermittelt wird.

7. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von *Prevotella intermedia* dadurch gekennzeichnet, daß eine biologische Probe entnommen wird, in einen An-

satz einer competitiven quantitativen PCR gegeben wird, der Vorwärts- und Rückwärts-Primer enthält, die an für *Prevotella intermedia* spezifischen Teilsequenzen im 16S rRNA-Gen binden und der Ansatz eine definierte Menge einer Standard-DNA enthält, die in einer vorangegangenen PCR-Reaktion unter Verwendung von Vorwärts-Primer und einem Hybrid-Primer, der an eine Basenfolge innerhalb der mit Vorwärts- und Rückwärts-Primer amplifizierten Templatesequenz bindet und an seinem 5'-Ende die Sequenz des Rückwärts-Primers trägt, hergestellt wurde

und der an sich bekannte, für die PCR erforderliche Hilfs- und Nebenstoffe enthält, der Ansatz einschließlich der biologischen Probe 40 mal folgendem Temperaturregime unterworfen wird: initiale Denaturierung: 10 min 95°C, Denaturierung: 1 min 95°C, Annealing: 1 min 60°C, Extension: 1 min 72°C, Final Extension: 10 min 72°C

und quantitativ die beiden entstandenen Produkte entweder nach Auftrennung der Amplifikate in der Agarosegelektrophorese und DNA-Färbung mittels Ethidiumbromid durch Videodensitometrie oder

bei Verwendung eines der beiden PCR-Primer in 5'-biotinylierter Form nach Immobilisieren an fixiertem Streptavidin durch Hybridisierung mit zwei an verschiedene Produktsequenzen bindende, Digoxigenin-markierte Sonden mittels Enzyme-linked Oligonukleotide Sorbent Assay unter Verwendung Enzym-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper bestimmt werden und anschließend aus dem Verhältnis der beiden Produktkonzentrationen und der bekannten Menge des zum PCR-Ansatz zugegebenen Standards die DNA-Menge der Probe ermittelt wird.

8. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von *Eikenella corrodens* dadurch gekennzeichnet, daß eine biologische Probe entnommen wird, in einen An-

satz einer competitiven quantitativen PCR gegeben wird, der Vorwärts- und Rückwärts-Primer enthält, die an für *Eikenella corrodens* spezifischen Teilsequenzen im 16S rRNA-Gen binden und der Ansatz eine definierte Menge einer Standard-DNA enthält, die in einer vorangegangenen PCR-Reaktion unter Verwendung von Vorwärts-Primer und einem Hybrid-Primer, der an eine Basenfolge innerhalb der mit Vorwärts- und Rückwärts-Primer amplifizierten Templatesequenz bindet und an seinem 5'-Ende die Sequenz des Rückwärts-Primers trägt, hergestellt wurde

und der an sich bekannte, für die PCR erforderliche Hilfs- und Nebenstoffe enthält, der Ansatz einschließlich der biologischen Probe 40 mal folgendem Temperaturregime unterworfen wird: initiale Denaturierung: 10 min 95°C, Denaturierung: 1 min 95°C, Annealing: 1 min 55°C, Extension: 1 min 72°C, Final Extension: 10 min 72°C

und quantitativ die beiden entstandenen Produkte entweder nach Auftrennung der Amplifikate in der Agarose-

gelektrophorese und DNA-Färbung mittels Ethidiumbromid durch Videodensitometrie oder bei Verwendung eines der beiden PCR-Primer in 5'-biotinylierter Form nach Immobilisieren an fixiertem Streptavidin durch Hybridisierung mit zwei an verschiedene Produktsequenzen bindende, Digoxigenin-markierte Sonden mittels Enzyme-linked Oligonukleotide Sorbent Assay unter Verwendung Enzym-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper bestimmt werden und anschließend aus dem Verhältnis der beiden Produktkonzentrationen und der bekannten Menge des zum PCR-Ansatz zugegebenen Standards die DNA-Menge der Probe ermittelt wird.

9. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eubakterien in ihrer Summe nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die für die Primerbindung benutzten in 16S rRNA-Genen von Eubakterien hochkonservierten Teilsequenzen 282 Basenpaare voneinander entfernt sind.

10. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Menge Standard-DNA mit Hilfe bekannter absorptionsphotometrischer Methoden vorab bestimmt wird und zur erwarteten Menge Bakterien-DNA in der Probe korreliert wird.

11. Verfahren nach Anspruch 2 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Hybrid-Primer an eine Basenfolge innerhalb der mit Vorwärts- und Rückwärts-Primer an *E. coli* DNA amplifizierten Templatesequenz bindet und an seinem 5'-Ende die Sequenz des Vorwärts- oder Rückwärts-Primers trägt.

12. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eubakterien in ihrer Summe nach Anspruch 1, 2, 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß

eine biologische Probe entnommen wird, in einen An-

satz einer competitiven quantitativen PCR gegeben wird, der Vorwärts- und Rückwärts-Primer enthält, die an in 16S rRNA-Genen von Eubakterien hochkonservierte Teilsequenzen binden

und eine definierte Menge einer Standard-DNA enthält, die in einer vorangegangenen PCR-Reaktion unter Verwendung von Rückwärts-Primer und einem Hybrid-Primer, der an eine Basenfolge innerhalb der mit Vorwärts- und Rückwärts-Primer amplifizierten Templatesequenz bindet und an seinem 5'-Ende die Sequenz des Vorwärts-Primers trägt, hergestellt wurde, und der an sich bekannte, für die PCR erforderliche Hilfs- und Nebenstoffe enthält,

der Ansatz einschließlich der biologischen Probe 40

mal folgendem Temperaturregime unterworfen wird:

initiale Denaturierung: 10 min 95°C, Denaturierung:

1 min 95°C, Annealing und Extension: 1 min 66°C, Fi-

nal Extension: 10 min 66°C

und quantitativ die beiden entstandenen Produkte entweder nach Auftrennung der Amplifikate in der Agarosegelektrophorese und DNA-Färbung mittels Ethidiumbromid durch Videodensitometrie oder

bei Verwendung eines der beiden PCR-Primer in 5'-biotinylierter Form nach Immobilisieren an fixiertem Streptavidin durch Hybridisierung mit zwei an verschiedene Produktsequenzen bindende, Digoxigenin-markierte Sonden mittels Enzyme-linked Oligonukleotide Sorbent Assay unter Verwendung Enzym-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper bestimmt werden

und anschließend aus dem Verhältnis der beiden Produktkonzentrationen und der bekannten Menge des zum PCR-Ansatz zugegebenen Standards die DNA-Menge der Probe ermittelt wird.